

Violacein을 생산하는 *Massilia* sp. EP15224 균주

윤상홍^{1*}, 백희진², 권순우³, 이창묵¹, 심준수¹, 한범수¹, 구본성¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

²농림축산검역본부, 조류질병과

³농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Received: October 24, 2014 / Revised: December 10, 2014 / Accepted: December 10, 2014

Production of Violacein by a Novel Bacterium, *Massilia* sp. EP15224 Strain

Sang-Hong Yoon^{1*}, Hee-Jin Baek², Soon-Wu Kwon³, Chang-Muk Lee¹, Joon-Soo Sim¹, Bum-Soo Hahn¹, and Bon-Sung Koo¹

¹Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeonju 560-550, Republic of Korea

²Avian Disease Department, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Republic of Korea

³Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Republic of Korea

Violacein has received much attention due to its various important biological activities, including broad-spectrum antibacterial and antifungal activity, anti-malarial, anti-tumoral, anti-oxidant, and anti-diarrheal activities. EP15224 strain isolated from forest soils in Korea was found to be a new species belonged to the genus *Massilia* based on its 16S ribosomal DNA sequences. The 16S ribosomal DNA of strain EP15224 displayed 97% homology with *Massilia* sp. BS-1, the nearest violacein-producing bacterium. Strain EP15224 produced bluish-purple pigment well in a synthetic MM2 medium containing glucose, (NH₄)₂SO₄, Na₂HPO₄·7H₂O, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, and 1 mM L-tryptophan. The chemical analysis of the pigment by LC/MS/MS showed that it is violacein with molecular weight of 343.34. This is the second report on the production of violacein by a *Massilia* species. In this study, the optimal culture conditions for violacein production were established under which 280 mg/l crude violacein was produced : glucose 2 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, Na₂HPO₄·7H₂O 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l, L-tryptophan 0.24 g/l, 25 ml medium in a 250 ml flask, with an inoculum size of 10% (v/v), 72 h of cultivation with 250 rpm at 25°C.

Keywords: Violacein, purple-pigment, *Massilia* sp.

서 론

비올라세인은 아마존 강에서 분리된 *Chromobacterium violaceum*에 의해 생산되는 보라 색소 물질로 1881년에 학계에 처음 보고되었다. 이 후 *Shewanella Pseudoaltermonas*, *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Collimonas* 등과 같이 다양한 미생물 중에서도 이 물질이 생산된다는 것이 최근까지 계속 보고되고 있다[4, 10, 11, 14, 16, 18, 22].

비올라세인은 보라색 색소의 특성 외에도 다양한 생리활성을 가지기 때문에 산업적 응용성이 매우 광범위하여 최근에 많은 관심을 받고 있다. 예를 들어 그람 양성균과 곰팡이에 대한 항균활성, 항원생생물(anti-protozoan), 항말라리아,

항암성, 항바이러스, 항산화성, 항설사, 항궤양, 진통제, 면역조절능 등과 같은 다양한 의약적 기능이 보고되고 있다 [2, 3, 5-8, 12, 13, 15, 17, 19]. 이 밖에도 천연 및 합성 식물의 청, 보라색 염색제나 항산화성과 항균성을 이용한 친환경적 색소화장품(립스틱, 눈 화장 등), 또는 식품색소 첨가제로 응용 가능하며, 이 외에도 식물의 다양한 곰팡이 병이나 선충으로부터의 피해도 방제할 수 있는 농업적 응용이 시도되고 있다[4, 5]. 이러한 비올라세인의 산업적 가치가 높아짐에 따라 이를 생산하는 미생물에 대한 관심도 급격히 증가하고 있으며 특히 고 수율의 비올라세인 생산 증대기술에 필요한 새로운 균주 개발 및 생산 방법에 대한 연구가 최근에 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 한국의 삼림토양에서 분리 확보한 저 영양 세균자원에서 보라색 색소물질인 비올라세인을 생산하는 균주인 EP15224를 선발하였고, 기존 보고된 비올라세인 생산 세균들과 계통분류학적으로 다른 *Massilia* 종임을 확인하

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-4610, Fax: +82-63-238-4604

E-mail: shy3556@korea.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

였다. 또한 이 균주로부터 플라스크 배양상에서 비올라세인의 생산성을 높여주는 배지성분과 삼각플라스크 진탕 배양 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

미생물

본 연구에 사용된 EP15224 균주(한국농용미생물센터 타락균주 KACC91872P)는 산림토양에서 분리한 저 영양미생물자원에서 선발된 보라색소를 생산하는 균주이다.

배지 및 배양

EP15224 균주의 계대와 일반적 배양은 R2A (Difco사) 배지를 사용하였고 비올라세인을 생산하는 최적 조성을 찾기 위해서 MM2 합성배지 조성(MM2-B: 리터당 glucose 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 1 mM tryptophane; pH 6.8)을 이용하였다. 플라스크 진탕배양은 균 접종량 10% (v/v), 배양온도 25°C, 진탕 속도 250 rpm에서 3일간 실시하였다. 최적배지 조성을 찾기 위한 MM2 합성배지의 조성표는 Table 1과 같다. 이들 액체배지에서 5일간 배양하면서 주기적으로 채취한 배양액 내 비올라세인의 함량을 측정하여 가장 경제적인 생산의 최적 배지조성을 조사하였다. 비올라세인의 정량은 배양액 1 ml에 메탄올 3 ml를 부가하여 30분간 진탕시키고 원심분리한 상층을 585nm에서 흡광도를 측정하고 $\text{OD}_{585\text{nm}} = 0.12$ 일 때 2.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 환산하여 정량하였다[18].

비올라세인 추출, 분리

EP15224 균주를 200 ml의 MM2-B 액체배지(1리터 삼각플라스크)에 25°C, 250 rpm으로 3일간 진탕 배양한 뒤 원심분리하여(8,000 rpm, 10분) 상층액을 버리고 남은 보라색 균체에 200 ml 에탄올을 첨가하여 균체에서 보라색이 추출될 때까지 초음파처리를 10분 이상 실시하였다. 에탄올 추출액은 다시 원심분리하여(8,000 rpm, 10분) 균체를 제거하고 진공감압 농축하여 메탄올 20 ml로 최종 용해한 뒤, 이를 실리

카겔 칼럼(직경 25 mm × 길이 500 mm)에 로딩하고 메탄올로 보라색소를 분획하였으며 다시 진공감압 농축한 뒤 5 ml의 메탄올로 최종 용해하여 이를 LC/MS/MS의 분석시료로 사용하였다.

LC/MS/MS 분석

보라색소 물질은 역상칼럼(Mightysil RP-18 GP, 250 mm × 4.6 mm, Kanto Chemical, Tokyo, 일본)을 이용한 HPLC-PDA (Shimadzu, Japan; SPD-M20A)로 분리하였으며 580 nm 파장에서 피크를 검출하였다. 분리된 피크는 Waters사의 고해상 QTOF-ESI/MS [ACQUITY (UPLC, Waters Corp., USA) SYNAPT G2-S (Waters Corp., USA)]을 사용하여 MS/MS 분석을 수행하였다.

16S rRNA 염기서열 및 근연 관계 분석

선발된 EP15224의 분자생물학적 동정을 위해 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 및 1492R(5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3') primer로 PCR을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다(94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 30°C에서 1분 30초, 72°C에서 2분간, 34 사이클). 분리된 DNA는 PCR 2.1 Topo TA Vector system (Invitrogen사)에 클로닝하고 이를 ABI 3700 (Perkin Elmer, Co.) 기기로 염기서열분석을 수행하였다. 상동성은 GenBank DB의 Blast 프로그램을 이용하여 비교하였으며, 염기서열은 DNA Plus Version 3.0 Sequence Alignment 프로그램(Scientific and Educational Software)을 이용하여 병렬로 정렬하였다. EP15224 균주의 계통분석도(phylogenetic tree) 작성은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에서 비올라세인을 생산하는 것으로 보고된 다른 세균이나 이와 상동성이 높은 세균 종의 16S rRNA 유전자 염기서열과 비교 분석해서 MEGA version 5.0 [21]의 근린결합법[20]으로 작성하였다.

결과 및 고찰

비올라세인 생산 균주의 선발

한국의 산림 토양에서 분리한 800여 주의 저 영양미생물 자원으로부터 R2A 고체배지(Difco사) 상에서 보라색 집락을 형성하는 EP15224 균주를 육안으로 우선 1차 선발 분리하였다. 선발 균주에 의해 생산되어 추출된 보라색 색소물질은 HPLC에 의해 주 피크(retention time 4.52분)와 작은 피크(retention time 5.24분)로 분리되었다. 각각의 피크를 MS/MS로 분석한 결과, 주 피크는 molecular mass (m/z)가 344.1029 (positive), 작은 피크는 328.1089 (positive)으로 결정되었다(Fig. 1). 이는 violacein과 deoxyviolacein의 이론상 분자량이 각각 343.335와 327.335 달톤임을 고려하였을

Table 1. Compositions of four MM2 synthetic media

Media components	MM2-B	MM2-I	MM2-II	MM2-III
Glucose	2	2	2	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	1	1	1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4	2	1	0.5
KH_2PO_4	2	1	0.5	0.25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.1	0.1	0.1
Tryptophan	0.2	0.2	0.2	0.2

(g/l)

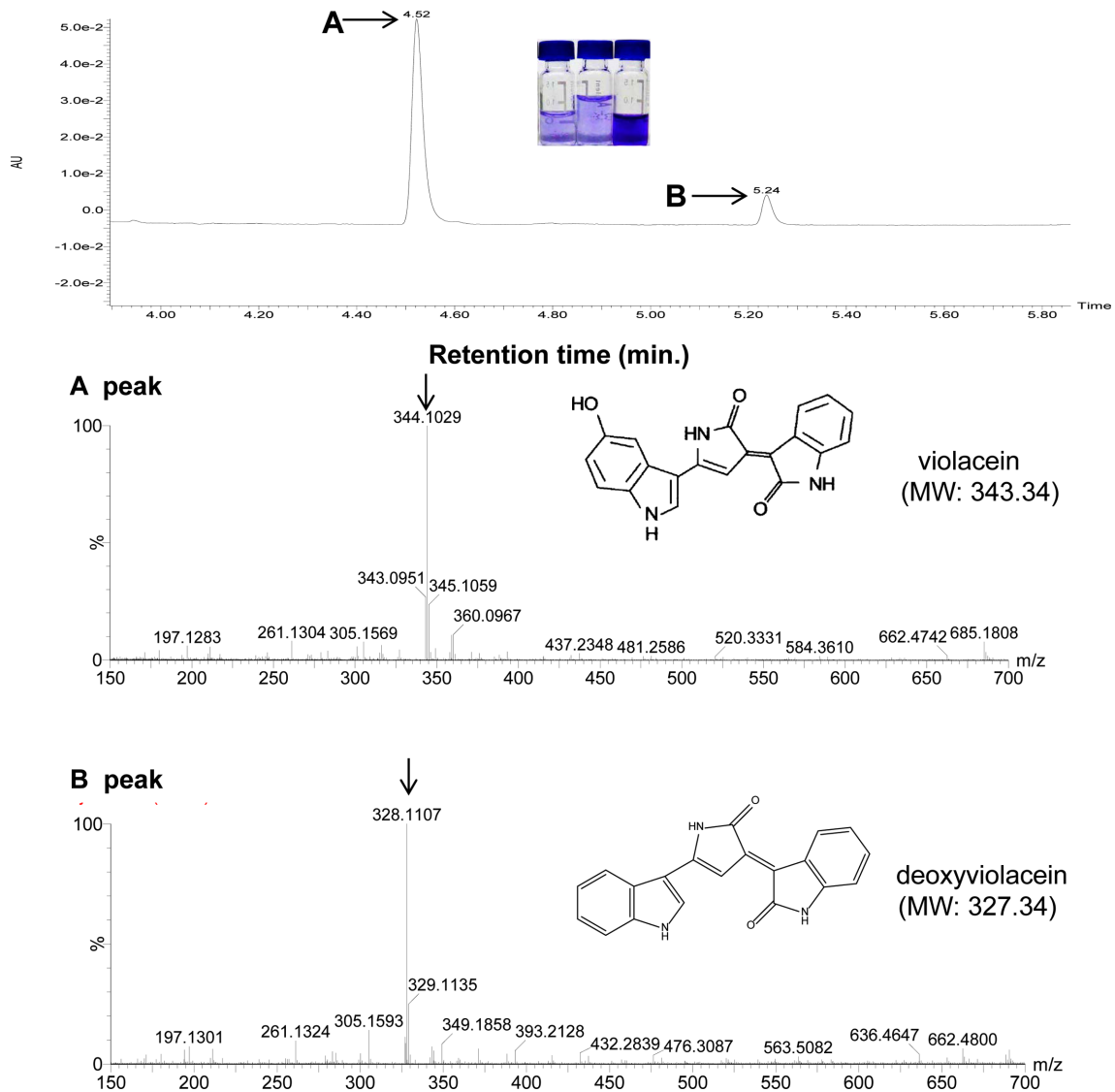


Fig. 1. HPLC chromatogram and MS/MS spectra of the purple-coloured pigment isolated from *Massilia* sp. EP15224 cultivated in MM2 synthetic liquid media.

때 이 균주가 생산하는 두 종의 보라 색소물질이 violacein과 deoxyviolacein임을 확인해 주는 결과이다. 그리고 HPLC 정량 분석결과는 EP15224 균주가 생산하는 보라색소 중 90% 이상이 violacein이라는 것을 제시하였다.

균주의 생리 생화학적 특성과 분류학적 위치

EP15224 균주는 운동성을 가지는 그람 음성 균의 호기성 간균이다. R2A 고체 배지에서 28°C로 배양하면 2일 후에는 보라색 집락으로 변한다. R2A 액체배양 시에는 25-28°C에서 균도 잘 자라고 보라색소의 생산량도 많지만 32°C 이상에는 균 성장은 우수하나 보라색소가 잘 형성되지 않았다.

API32GN에 의한 생화학반응을 분석한 결과에서 이 균주는 4개의 당(D-glucose, maltose, glycogen, D-mannitol)과 4개의 유기산(acetate, citrate, lactate, propionate)을 주 탄소원과 성장원으로 이용하였으나 L-rhamnose, D-ribose, sucrose, D-melibiose, L-fucose, L-arabinose, D-mannose는 이용하지 못하였다. 이것은 2011년 *Massilia* 종에서 비올라세인 생산으로 최초 보고된 *Massilia* sp. BS-1 균주가 8개의 당(D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-xylose, D-fructose, maltose, cellobiose, dextrin)과 3개의 유기산(acetate, citrate, malate)을 탄소원과 에너지원으로 이용한다는 결과와는 다른 특성을 보여준다[1]. 그리고 *Massilia*의

Table 2. Investigation of major carbon source utilization of EP15224 by API 32GN kit

Reactions of API 32GN	KACC12178 (<i>Massilia plicata</i>)	KACC12152 (<i>Massilia dura</i>)	EP15224
L-Rhamnose (RHA)	-	-	-
N-Acetylglucosamine (NAG)	-	-	-
D-Ribose (RIB)	-	-	-
Inositol (INO)	-	-	-
D-Saccharose (SAC), Sucrose	-	-	-
D-Maltose (MAL)	-	+	+
Itaconic acid (ITA)	-	-	-
Suberic acid (SUB)	-	-	-
Sodium malonate (MNT)	-	-	-
Sodium acetate (ACE)	-	-	+
Lactic acid (LAT)	-	-	+
L-Alanine (ALA)	-	+	-
Potassium 5-Ketogluconate (5KG)	-	-	-
Glycogen (GLYG)	-	+	+
3-Hydroxybenzoic acid (mOBE)	-	-	-
L-Serine (SER)	-	-	+
D-Mannitol (MAN)	-	-	+
D-Glucose (GLU)	-	+	+
Salicin (SAL)	-	-	-
D-Melibiose (MEL)	-	+	-
L-Fucose (FUC)	-	-	-
D-Sorbitol (SOR)	-	-	-
L-Arabinose (ARA)	+	+	-
Propionic acid (PROP)	-	-	+
Capric acid (CAP)	-	-	-
Valeric acid (VALT)	-	-	-
Trisodium Citrate (CIT)	-	+	+
L-Histidine (HIS)	-	-	+
Potassium 2-Ketogluconate (2KG)	-	-	-
3-Hydroxybutyric acid (3OBU)	-	+	+
4-Hydroxybenzoic acid (pOBE)	-	-	-
L-Proline (PRO)	-	-	+

표준균주로 사용한 KACC 12152와 12178의 생화학적 특성 과도 상이하였다.

또한 이 균은 16S rRNA 유전자 염기서열에서 *Massilia dura* KACC12152와 가장 높은 97.5%를 나타냈다. 그러나 이 표준 균주는 비올라세인을 생산하지 않음은 물론, 탄소원으로의 이용성을 조사한 API 32GN의 반응에서도 EP15224 균주와 많은 점이 달랐다(Table 2). 그리고 *Massilia* 종에서 처음으로 비올라세인의 생산을 보고한 *Massilia* sp. BS-1 균주와는 97%의 상동성을 보였기 때문에 EP15224 균주는

Massilia 속 내의 다른 종임을 의미하다. 또한 비올라세인을 생산하는 다른 종의 세균과 *Massilia* 표준균주들 간의 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거해 작성된 계통분석도 (phylogenetic tree)에서 보는 바와 같이 이 *Massilia* sp. EP15224는 다른 종들과 뚜렷이 구분되어 있다(Fig. 2).

비올라세인 최적 생산 조건

EP15224 균주가 플라스크 배양 수준에서 경제적으로 보라색의 색소물질인 비올라세인을 생산할 수 있는 최적의 배

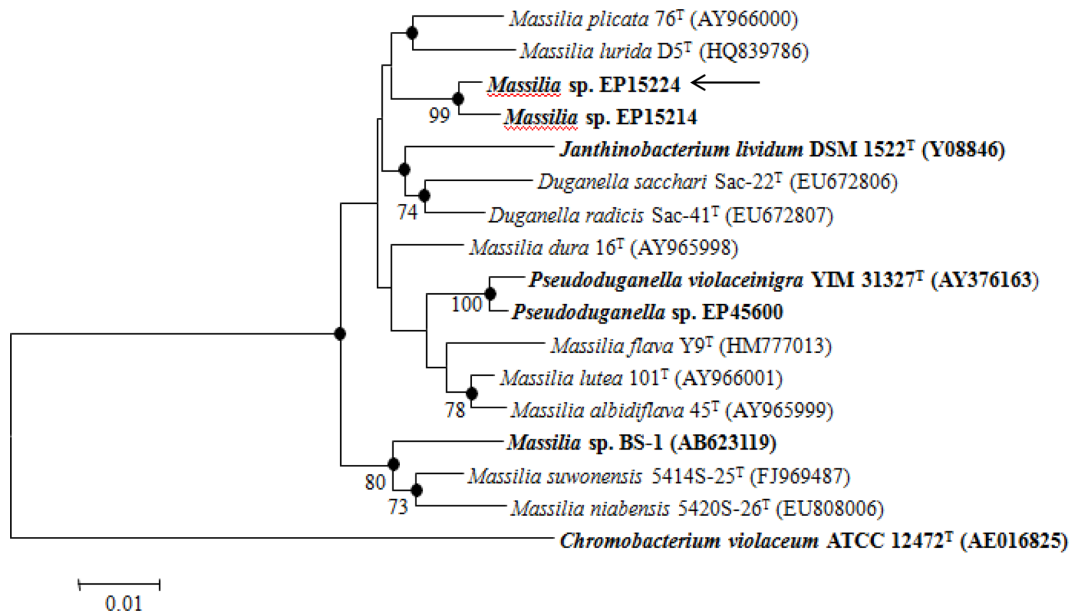


Fig. 2. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence showing phylogenetic relationships of strain EP15224 between its relatives and violacein-producing bacteria (bold letter). Filled circles at nodes indicate generic branches that were also recovered by using both maximum-parsimony and maximum likelihood algorithm. Bootstrap percentages (based on 1000 replications) >70% are shown at branching points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. The numbers in parentheses are accession numbers in the GenBank database. Also, EP45600 and EP15214 strains are obtained in this study.

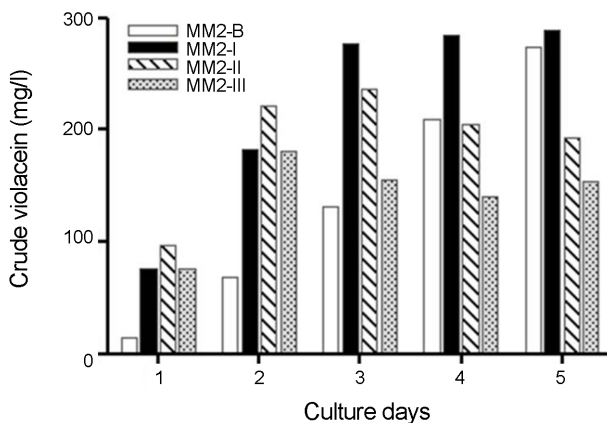


Fig. 3. Violacein production of *Massilia* sp. EP15224 according to the cultivation period in four MM2 synthetic liquid media with different component compositions. *Massilia* sp. EP15224 was cultivated using a 1-L Δ flasks with agitation (250 rpm) at 25°C.

지 조성 및 배양 조건을 조사하였다. MM2-B 기본 액체배지를 사용하여 22-37°C에 걸친 비올라세인 생산능을 분석하였을 때, 32°C 이상에서는 보라색소 생산능이 현저히 떨어졌으며 37°C에서는 균의 성장은 왕성하나 색소생산을 관찰할 수 없었다. 이와 반면에 22-28°C에서는 비교적 우수한 생산

능을 보였으나 배양일 3일 기준으로 볼 때 25°C가 우수한 비올라세인 생산 온도였다. 그리고 균의 접종량을 비교하였을 때, 1% 보다는 10%로 접종하면 배양기간이 크게 단축되며 생산량도 현저히 높아졌다. 또한, MM2-B 기본배지에서 탄소원으로 0.2% glucose, 질소원으로 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM tryptophane, 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 고정하고 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 KH_2PO_4 의 농도를 달리한 Table 1의 배지조성에 따라 비올라세인 생산량을 5일간 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. MM2-B 배지를 제외한 3종의 MM2배지 모두 배양 3일까지는 비례적으로 생산이 증가했으나 그 이후엔 생산량이 증가되지 않았다. 그러나 MM2-B 배지는 5일까지 증가했지만 생산량은 3일째 MM2-I 배지에 미치지 못했다. MM2-I 배지에서 배양 3일을 기준으로 비올라세인은 리터당 최대 280 mg까지 생산되었으며 이는 *Massilia* sp. BS-1에 의해 보고된 비올라세인 최대 생산량 40 mg/l 보다 높은 결과이다. 특히 *Massilia* sp. BS-1의 경우 tryptophane과 histidine이 동시에 첨가되었을 때 비올라세인 생산량이 높았으나 본 균주는 tryptophane 첨가만으로도 생산이 증가되었다. 그리고 본 균주는 영양분이 풍부한 Luria-Bertani 액체배지나 nutrient 액체배지에서 성장은 잘 되지만 보라색소 생산능은 현저히 저하되었다. 그러나 배지 내 영양 성분 함량이 매우 낮은 저영양배지인 R2A 액체배지나 MM2 합성액체배지에서 보라색소의 생산이 우수해지는 것은 기존의 비올라세인 생산 균

주의 보고와는 다른 점이며 이는 실용화 단계에서 생산단가를 낮출 수 있는 장점이 될 수 있다.

요약

비올라세인은 항균, 항암, 항산화, 항말라리아, 항설사 활성과 같은 다양한 생리활성을 가지는 보라색소 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 한국의 산림토양에서 분리되었으며 보라색 색소를 생산하는 EP15224 균주를 선발하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 *Massilia* sp. BS-1과 97%의 가장 높은 상동성을 보였다. 또한 16S rRNA 유전자에 근거한 계통분류학적 분석에서 EP15224는 기존 보고된 비올라세인 생산 세균들과는 별개로 구분되는 *Massilia* 속의 새로운 종임을 확인하였다. 이 균주가 생산하는 보라색 소물질을 분리하여 LC/MS/MS로 분석한 결과, 분자량이 343.34인 비올라세인과 일치하였다. 또한 비올라세인의 생산 효율을 높여주는 최적의 배지 성분 [glucose 2 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, Na₂HPO₄·7H₂O 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l, L-tryptophan 0.24 g/l]과 배양 조건 [25°C에서 72시간 배양, 250 rpm, 10% 접종량]을 조사하였으며 이 조건에서 액체 배양 하였을 때 리터 당 280 mg의 비올라세인이 생산되었다.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Academy of Agricultural Sciences (Project No. PJ008649).

References

- Agematu H, Suzuki K, Tsuya H. 2011. *Massilia* sp. BS-1, a novel violacein-producing bacterium isolated from soil. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 2008-2010.
- Antonisamy P, Ignacimuthu S. 2010. Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*. *Phytomedicine* **17**: 300-304.
- Antonisamy P, Kanna P, Ignacimuthu S. 2009. Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* in Wistar rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **23**: 483-490.
- Aranda S, Montes-Borrego M, Landa BB. 2011. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. Inhibit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. *Microb. Ecol.* **62**: 446-459.
- Baek SH, Kang HS, Jang IH, Lee JS, Kim SY, Ahn JM. 2007. Insecticide and fungicide containing violacein, and their preparation method. *Republic Korean Kongkae Taekho Kongbo KR 2007088150A*.
- De Azevedo MBM, Alderete J, Rodriguez JA, Haun M, et al. 2000. Biological activities of violacein, a new anti-tumoral indol derivative, in an inclusion complex with beta-cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **37**: 93-101.
- Duran N, Campos V, Riveros R, Joyas A, Pereira MF, Haun M. 1989. Bacterial chemistry-III: Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An. Acad. Bras. Cienc.* **61**: 31-36.
- Duran N, Melo PS, Haun M. 1996. In vitro evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma and human tumor cell lines. *In 25th Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology*. p. 150.
- Duran M, Ponezi AN, Alario AF, Teixeira MFS, Justo GZ, Duran N. 2012. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Med. Chem. Res.* **21**: 1524-1532.
- Hakvag S, Fjarvik E, Klinkenberg G, Borgos SEF, Josefsen KD, Ellingsen TE, et al. 2009. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in trøndelag, Norway. *Mar. Drugs* **7**: 576-588.
- Kobayashi H, Nogi Y, Horikoshi K. 2007. New violet 3,3-bipyridyl pigment purified from deep-sea microorganism *Shewanella violacea* DSS12. *Extremophiles* **11**: 245-250.
- Konzen M, De Marco D, Cordova CAS, Vieira TO, Antonio RV, Pasa TBC. 2006. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 8307-8313.
- Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Duran N. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J. Antimicro. Chemother.* **48**: 449-450.
- Li WJ, Zhang YQ, Park DJ, Li CT, Xu LH, Kim CJ, et al. 2004. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1811-1814.
- Lopes SCP, Blanco YC, Justo GZ, Costa FTM, et al. 2009. Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 2149-2152.
- MacCarthy SA, Sakata T, Kakimoto D, Johnson RM. 1985. Production and isolation of purple pigment by *Altermonas luteoviolacea*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **51**: 479-484.
- Nakamura Y, Asada C, Sawada T. 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 Strain. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **8**: 37-40.
- Pantarella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. 2007. Violacein and biofilm production in *Janthobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 992-999.
- Rettori D, Duran N. 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 685-688.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

21. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739.
22. Yang LH, Xiong H, Lee OO, Qi SH, Qian PY. 2007. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoaltermonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**: 625-630.